

機関番号：82648

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008~2012

課題番号：20107004

研究課題名（和文）NMR を利用したタンパク質および複合糖質の揺らぎの検出とその機能関連の探査

研究課題名（英文）NMR detection of conformational fluctuations of proteins and glycoconjugates for exploration of their correlations with biological functions

研究代表者

加藤 晃一 (KATO KOICHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20211849

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：NMR、揺らぎ、糖鎖、タンパク質、複合糖質

1. 研究計画の概要

NMR 分光法を中心とする構造生物学的手法を用いて、生体高分子の水溶液中における揺らぎを検出し、得られた知見をもとに、分子およびその複合体の動的3次元構造を原子レベルの分解能で探査する。とりわけ、糖タンパク質、多ドメインタンパク質、天然変性タンパク質などを対象とした揺らぎの解析を研究計画の中心におき、分子機能との関連を探求する。特に、内部運動の自由度が高く従来のアプローチでは構造解析が困難であった糖鎖や、複雑なタンパク質・複合糖質およびそれらの超分子複合体の動的3次元構造を、920MHz 超高磁場 NMR 装置を縦横に活用することで解析し、様々な時間的・空間的スケールの分子構造の揺らぎと分子認識の関連を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の進捗状況

(1)糖鎖の NMR 解析

①N型糖鎖のプロセッシングにかかわる酵素の遺伝子を破壊した酵母変異体を用いて、均一な化学構造を有する高マンノース型糖鎖を大量に調製する方法を確立した。この際、¹³C 標識グルコースを代謝前駆体として用いることにより、糖鎖を均一にあるいは部位選択的な安定同位体標識を施すことに成功した。

②糖鎖の還元末端に導入した EDTA アナログに種々のランタニドイオンを配位し、それによってもたらされる常磁性効果を利用して、糖鎖の動的立体構造情報を得る方法を開発した。

(2)GM1 クラスタと Aβ の相互作用の NMR 解析

lyso-GM1 ミセルを GM1 クラスタのモ

デルとして 920 MHz NMR 計測を行い、Aβ との相互作用様式を明らかにした。これにより GM1 クラスタは、Aβ 分子の α ヘリックス形成を誘起する場を提供するとともにその空間配置を規定していることが明らかとなった。

(3)マルチドメインタンパク質の NMR 解析

①環状型および野生型のユビキチン 2 量体を試験管内酵素反応を用いて調製し、NMR 解析を行った。その結果、環状型ユビキチンは疎水表面を溶媒から遮蔽した構造を呈しており、野生型ユビキチン 2 量体はこうした閉構造と疎水表面が露出した開構造の間を揺らいでいることが明らかとなった。

②プロテインジスルフィドイソメラーゼの基質結合ドメインについて、NMR と X 線小角散乱を利用した構造解析を行った。その結果、活性部位のジスルフィド結合の形成・開裂と連動してドメイン間の距離が変化しており、酸化状態ではドメイン界面に位置している疎水性に富む基質結合部位の露出度がより増大していることが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

細胞内レクチンが構成する血液凝固因子輸送装置の立体構造変化の解明など、当初の年次計画上の進展予測を上回る研究成果も得られている。

4. 今後の研究の推進方策

安定同位体標識技術と超高磁場 NMR 法を活用した揺らぎの研究を、複雑な分岐構造を有する糖鎖およびそのクラスタ、さらにはタ

ンパク質との相互作用系に拡張する。一方、多ドメインタンパク質の動的構造解析を更に発展させて、多サブユニットタンパク質の4次構造揺らぎの検出にも取り組む。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 29 件)

①M. Nakasako, A. Maeno, E. Kurimoto, T. Harada, Y. Yamaguchi, T. Oka, Y. Takayama, A. Iwata, and K. Kato, Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase from a thermophilic fungus. *Biochemistry* **49**, 6953-6962 (2010) 査読有。

②K. Kato, Y. Yamaguchi, and Y. Arata, Stable-isotope-assisted NMR approaches to glycoproteins using immunoglobulin G as a model system. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **56**, 346-359 (2010) 査読有。

③M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, and K. Kato, NMR characterization of the interactions between lyso-GM1 aqueous micelles and amyloid β . *FEBS Lett.* **584**, 831-836 (2010) 査読有。

④M. Nishio, Y. Kamiya, T. Mizushima, S. Wakatsuki, H. Sasakawa, K. Yamamoto, S. Uchiyama, M. Noda, A. R. McKay, K. Fukui, H. -P. Hauri, and K. Kato, Structural basis for the cooperative interplay between the two causative gene products of combined factor V and factor VIII deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 4034-4039 (2010) 査読有。

⑤O. Serve, Y. Kamiya, A. Maeno, M. Nakano, C. Murakami, H. Sasakawa, Y. Yamaguchi, T. Harada, E. Kurimoto, M. Utsumi-Yagi, T. Iguchi, K. Inaba, J. Kikuchi, O. Asami, T. Kajino, T. Oka, M. Nakasako, and K. Kato, Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface. *J. Mol. Biol.* **396**, 361-374 (2010) 査読有。

[学会発表] (計 58 件)

①K. Kato, Sugar-protein interaction systems as potential therapeutic targets. 98th Indian Science Congress 2011年1月5日. Chennai (India).

②K. Kato, Stable-isotope-assisted NMR approaches to structural glycomics. 20th

International Symposium on Glycoconjugates 2009年11月30日. San Juan (Puerto Rico).

[図書] (計 4 件)

①O. Serve, Y. Kamiya, and K. Kato, Redox-dependent chaperoning, following PDI footsteps. *Protein Folding* (E. C. Walters ed.), NOVA Science Publishers (New York), pp. 489-500 (2011) .

②加藤晃一, 矢木真穂, 神経変性疾患にかかわる天然変性タンパク質の分子構造ダイナミクス. Medical Bio 別冊 揺らぎと生体機能 (寺嶋正秀編), オーム社, 32-37 (2010).

③Y. Kamiya, D. Kamiya, R. Urade, T. Suzuki, and K. Kato, Sophisticated modes of sugar recognition by intracellular lectins involved in quality control of glycoproteins. *Glycobiology Research Trends* (G. Powell and O. McCabe ed.), NOVA Science Publishers (New York), pp. 27-40 (2009) .

④神谷由紀子, 加藤晃一, 細胞内レクチンによる糖蛋白質の輸送と品質管理の構造基盤. 糖鎖情報の独自性と普遍性 (古川鋼一, 遠藤玉夫, 岡 昌吾, 本家孝一, 加藤晃一編集), 共立出版, pp. 1662-1669 (2009) .

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 残余双極子相互作用の解析方法及び残余双極子相互作用解析用試薬

発明者: 藤田 誠, 佐藤宗太, 諸原 理, 加藤晃一, 山口芳樹

権利者: 国立大学法人東京大学, 大学共同利用機関法人自然科学研究機構, 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2009-057080

出願年月日: 平成 21 年 3 月 10 日

国内外の別: 国内

[その他]

研究成果に関する web ページ

<http://www.ims.ac.jp/topics/2010/110217.html>

新聞報道

日経産業新聞 2010 年 1 月 19 日

科学新聞 2010 年 1 月 29 日

日経産業新聞 2010 年 2 月 16 日

科学新聞 2010 年 3 月 5 日